

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-503050

(43) 公表日 平成9年(1997)3月25日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
G 0 1 N 33/53		0276-2 J	G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 K 14/47	Z N A	8517-4H	C 0 7 K 14/47	Z N A
16/18		8517-4H	16/18	
17/00		8517-4H	17/00	
C 1 2 P 21/08		9358-4B	C 1 2 P 21/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平6-525774	(71) 出願人	フォートロン バイオサイエンス インク.
(86) (22) 出願日	平成6年(1994)5月16日		アメリカ合衆国 27560 ノースキャロライナ州 モリスビル、ゲイトウェイセンター プルバード 2500 スイート 775
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)11月17日	(72) 発明者	ウィックス リチャード ダブルユー.
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 4 / 0 5 4 6 8		アメリカ合衆国 27511 ノースキャロライナ州 キャリー、カントリーサイド レイン 110
(87) 国際公開番号	W O 9 4 / 2 7 1 5 6	(74) 代理人	弁理士 石田 喜樹
(87) 国際公開日	平成6年(1994)11月24日		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 0 6 3 , 1 6 8		
(32) 優先日	1993年5月17日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 心臓トロポニン▲I▼のアッセイ

## (57) 【要約】

心臓のトロポニン I の検出方法を説明する。この検出方法は、一方の結合パートナーとして心臓のトロポニン I に特異的な抗体を、もう一方の結合パートナーとしてトロポニン C を用いたサンドイッチアッセイである。

## 【特許請求の範囲】

1. 生物学的液体中の心臓トロポニン I を定量するためのアッセイであって：

a. i) 生物学的液体サンプル；

ii) 心臓トロポニン I に特異的な抗体、又は、抗体断片；及び

iii) トロポニン C、又は、そのトロポニン I 結合断片を、

前記サンプル中のトロポニン I、前記抗体、及び、前記トロポニン C が三元複合体を形成するような条件下で、連続的、又は、同時にインキュベートし；

b. 前記サンプルから前記三元複合体を分離し；

c. 前記生物学的液体中の心臓トロポニン I の量の指標として、前記三元複合体の形成を検出する、

ことを特徴とするアッセイ。

2. 前記生物学的液体サンプル、前記抗体又はその断片、及び、トロポニン C 又はその断片が、三元複合体を形成するために、一緒に同時にインキュベートされる、ことを特徴とする請求項 1 記載のアッセイ。

3. 前記抗体、及び、前記サンプルが、前記抗体と前記サンプル中のトロポニン I との間で二元複合体を形成するためにインキュベートされ、次いで、前記二元複合体、及び、トロポニン C が、前記三元複合体を形成するために一緒にインキュベートされる、ことを特徴とする請求項 1 記載のアッセイ。

4. 前記抗体が、固相に固定化されている、ことを特徴とする請求項 1 記載のアッセイ。

5. 前記トロポニン C が、固相に固定化されている、ことを特徴とする請求項 1 記載のアッセイ。

6. 前記固相が、プラスチック面である、ことを特徴とする請求項 4 記載のアッセイ。

7. 前記生物学的液体が、血清である、ことを特徴とする請求項 1 記載のアッセイ。

8. 前記トロポニン C が、酵素標識されており、前記三元複合体の形成が、前記

三元複合体に関わる酵素活性の測定によって検出される、ことを特徴とする請求

項1記載のアッセイ。

9. 前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、及び、ベータガラクトシダーゼから成る群より選択される、ことを特徴とする請求項8記載のアッセイ。

10. 前記トロポニンCが、ウサギの骨格筋から得られたものである、ことを特徴とする請求項1記載のアッセイ。

11. 前記抗体が、骨格トロポニンIには存在しない心臓トロポニンIの領域に対して少なくとも75%の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニンIの対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも50%のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が固相へ結合できるような条件下で接触させ；固相を抗血清から分離し、その後、結合した抗体を固相から溶出することによって調製される、心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項1記載のアッセイ。

12. 前記ペプチドが：

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

から成る群より選択される配列全体、又は、配列の一部のアミノ酸配列を持つ、ことを特徴とする請求項11記載のアッセイ。

13. 前記抗体が、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、又は、その一部のアミノ酸配列を持つペプチドに特異的なモノクローナル抗体、又は、ポリクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項1記載のアッセイ。

14. 心臓トロポニン1のアッセイを行うための試薬を含むキットであって：

a. 心臓トロポニンIに特異的な抗体、又は、抗体断片、及び、

b. トロポニンC、又は、そのトロポニンI結合断片、

から成る、ことを特徴とするキット。

15. 前記トロポニンCが、酵素標識されている、ことを特徴とする請求項14記載のキット。

16. 前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、及び、ベータガラクトシダーゼから成る群より選択される、ことを特徴とする請求項15記載のキット。

17. 前記トロポニンCが、ウサギの骨格筋から得られたものである、ことを特徴とする請求項14記載のキット。

18. 前記抗体が、

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

から成る群より選択されるペプチドに特異的なモノクローナル抗体、又は、ポリクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項14記載のキット。

19. 生物学的液体中の心臓トロポニンIを定量するための固相イムノアッセイ

であって：

a. i) 生物学的液体サンプル；

i i) 心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体、又は、抗体断片を含む固相免疫吸着剤；及び

i i i) 標識トロポニン C、又は、そのトロポニン I 結合断片を、

前記サンプル中のトロポニン I が、前記固定化抗体、及び、前記標識トロポニン C と複合体を形成するために十分な条件下で、同時にインキュベートし；

b. 前記サンプルから前記固相免疫吸着剤を分離し；

c. 前記生物学的液体中の心臓トロポニン I の量の指標として、前記固相に結合した標識トロポニン C 又はその断片の量、又は、結合していない標識トロポニン C 又はその断片の量を検出する、

ことを特徴とする固相イムノアッセイ。

20. 前記生物学的液体が、血清である、ことを特徴とする請求項 19 記載のイムノアッセイ。

21. 前記固相が、プラスチック表面である、ことを特徴とする請求項 19 記載のイムノアッセイ。

22. 前記トロポニン C が、酵素標識されている、ことを特徴とする請求項 19 記載のイムノアッセイ。

23. 前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、及び、ベータガラクトシダーゼから成る群より選択される、ことを特徴とする請求項 22 記載のイムノアッセイ。

24. 前記トロポニン C が、ウサギの骨格筋から得られたものである、ことを特徴とする請求項 19 記載のイムノアッセイ。

25. 前記抗体が、骨格トロポニン 1 には存在しない心臓トロポニン I の領域に対して少なくとも 75% の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニン I の対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも 50% のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニン I 抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が固相へ結合できるような条件下で接触させ；固相を抗血清から分離

し、その後、結合した抗体を固相から溶出することによって調製される、心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項 19 記載のイムノアッセイ。

26. 前記ペプチドが：

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

から成る群より選択される配列全体、又は、配列の一部のアミノ酸配列を持つ、  
ことを特徴とする請求項 25 記載のイムノアッセイ。

27. 前記ポリクローナル抗体が、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

というペプチドに特異的である、ことを特徴とする請求項 19 記載のイムノアッセイ。

28. トロポニン I の固相イムノアッセイを行うための試薬キットであって：

a. 心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体、又は、抗体断片を含む固相免疫吸着剤、及び、

b. 標識トロポニン C、又は、そのトロポニン I 結合断片、  
から成る、ことを特徴とするキット。

29. 前記トロポニン C が、酵素標識されている、ことを特徴とする請求項 28 記載のキット。

30. 前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、及び、ベータ

ガラクトシダーゼから成る群より選択される、ことを特徴とする請求項29記載のキット。

31. 前記トロポニンCが、ウサギの骨格筋から得られたものである、ことを特徴とする請求項28記載のキット。

32. 前記ポリクローナル抗体が、

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

から成る群より選択されるペプチドに特異的である、ことを特徴とする請求項28記載のキット。

33. MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

から成る群より選択されるペプチドに特異的なポリクローナル抗体。

34. MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-

ALA-ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-  
PRO-ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-  
ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA  
から成る群より選択されるペプチドに特異的なモノクローナル抗体。

35. 骨格トロポニンIには存在しない心臓トロポニンIの領域に対して少なくとも75%の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニンIの対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも50%のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が固相へ結合できるような条件下で接触させ；固相を抗血清から分離し、その後、結合した抗体を固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体製剤。

36. MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-A  
LA-ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-P  
RO-ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-A  
RG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-L  
YS-LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA、

及び、これらの一部分から成る群より選択されるペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が固相へ結合できるような条



件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする請求項 35 記載の心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体製剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 心臓トロポニン I のアッセイ

## 発明の背景

心筋梗塞（“心臓発作”）の診断確認のために最も広く用いられているインビトロ試験は、血清中のクレアチンキナーゼMBアイソザイム（EC 2. 7. 3. 2）の検出である。一般には、この試験によって十分な結果が得られるが、いくつかの不都合のために、この試験の有用性は限られている。不都合の一例は、心筋梗塞後にこの試験が陽性となる期間が比較的短い（24－48時間）ことである。梗塞後48時間以上たってから患者が病院に到着した場合には、一般に、CK-MB試験では、心臓発作の診断を確認することはできない。さらに、CK-MBアイソザイムは骨格筋組織にも少量含まれているので、骨格筋組織に外傷を有する患者（例えば、自動車事故によって）では、偽陽性の結果が出て、心筋梗塞の診断が困難になることがある。

このような問題を回避するために、多くの研究者が、筋肉タンパク質であるトロポニン I のような、代替となる心筋障害の血清マーカーを検討してきた。トロポニン I は、筋肉収縮装置の細いフィラメント上に存在するトロポニン複合体の3つのサブユニットのうちの1つである。このトロポニン複合体は、筋肉の収縮過程の制御において中心的な役割を果たしており、そのため、これらの3つのサブユニットは調節タンパク質と呼ばれている。その他の2つのサブユニット（T及びCと呼ばれる）も、心筋組織と骨格筋組織の両方において、トロポニン I と並んで、細い筋フィラメント上に固定されている。トロポニン I は、心筋組織、緩徐骨格筋組織、及び、速骨格筋組織の様々な遺伝子にコードされている。ヒトにおいては、これら3つの型のトロポニン I のあいだで、アミノ酸配列の約60%が相同である。心臓型の非相同領域を用いれば、2つの骨格型と交差反応を起こさないような抗体を開発することができ、真に心臓に特異的な試験の開発が可能となる。

Cummins, et al. (1987) American Heart Journal 113:1333-1344には、ヒト血清中の心臓トロポニ

ンIを測定するためのラジオイムノアッセイの開発が記載されている。このアッセイは、トロポニンIの骨格型と有意に交差反応をするポリクローナル抗体を用いており、心筋梗塞の診断確認における有用性は限られている。また、この試験の感受性は、血清中の低レベルのトロポニンIを検出するには不十分であった。

Bod ar, et al. (1992) Clinical Chemistry 38:22. 3-2214には、2つのモノクローナル抗体を用いた血清トロポニンIの”サンドイッチ”アッセイ法が開発が記載されている。このアッセイ法では、モノクローナル抗体を用いることにより、心臓に対する特異性が向上しているが、2種類の異なるモノクローナル抗体を使用することが必要となる。また、検査法としては、このアッセイ法は不正確すぎた(11-21%の変動係数)。

#### 発明の要旨

本発明は、生物学的液体中の心臓トロポニンI濃度を定量的に決定するための方法、及び、診断試験系に関するものである。本発明によれば、一方の免疫結合パートナーが心臓型トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体、又は、モノクローナル抗体であり、他方の結合パートナーがトロポニン複合体のCサブユニットであるような、いわゆる”サンドイッチ”イムノアッセイを行うことが可能となることが発見された。この方法と試験系は、生物学的液体中のトロポニンIを素早く、特異的に測定する方法を提供するものであり、心筋障害の診断確認に非常に適している。

一般に、本発明の方法は、試験すべき生物学的液体、心臓トロポニンIに特異的な抗体又は抗体断片、及び、トロポニンC又はトロポニンCのトロポニンI結合断片を、サンプル中のトロポニンI、抗体、及び、トロポニンCが三元複合体を形成するような条件下で、連続的、又は、同時にインキュベートすることから成る。この複合体をサンプルから分離し、生物学的液体中の心臓トロポニンI量の指標として、複合体の形成量を検出する。

#### 発明の詳細な説明

本発明によれば、心臓に特異的な抗体とトロポニンCサブユニットとの組み合わせを用いたサンドイッチイムノアッセイ法によって、生物学的液体中のトロポ

ニン I 濃度を定量できる。この発明においては、全血、血清、血漿、リンパ液、尿、汗、胆液、羊水、脳脊髄液、痰、などの生物学的液体を使用できる。心臓、骨格筋、腎臓、脳、肝臓、などの組織抽出液も、本発明の方法で使用可能である。しかし、本発明に適した生物学的液体は、血清、又は、血漿である。

より詳細には、本発明は、2つの結合パートナーが使用されるイムノアッセイ試験系であって、2つの結合パートナーの各々がトロポニン I 抗原と結合可能であり、一方が心臓型トロポニン I に特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体（又はそれらの混合物）であり；第二の結合パートナーがトロポニン複合体のCサブユニットであるような、イムノアッセイ試験系に関する。

本発明のある好ましい実施態様においては、2つの結合パートナーのうちの一方が、固相表面に固定化されており、第二の結合パートナーが、信号を発生するマーカーで標識されている。本発明においては、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体（又はそれらの混合物）が、心臓型トロポニン I に特異的であり、骨格型のトロポニン I と有意な反応を起こさないことが重要である。これは、トロポニンのCサブユニットが、心臓型トロポニン I と骨格型トロポニン I の両方に対して、かなりの反応性を有するためである。従って、骨格型のトロポニン I と有意に反応するような抗体を用いると、骨格筋組織に障害を有する患者において、偽陽性反応が起こることがある。

本発明のある好ましい実施態様においては、当業者に知られた様々な方法によって、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体（又はそれらの混合物）を、適切な固相表面に固定化する。本発明の固相表面は、一つの特定のものには限定されない。固相表面は、当業者に知られたプラスチックチューブ、ビーズ、マイクロタイタープレート、ラテックス粒子、磁石粒子、セルロースビーズ、アガロースビーズ、紙、ディップスティック、などから選択できる。抗体、又は、トロポニンCの固定化方法は狭い範囲で限定されているものではなく、受動的吸収、共有結合、物理的トラッピング、などが含まれる。

本発明において固相として用いられる結合パートナーは、当業者に知られた方法で、固相表面に直接付着させてもよいし、又は、イムノアッセイのインキュベーション中に（インサイチュで）固定化してもよい。例えば、固相表面をアビジ

ン又はストレプトアビジンでコートして、第一結合パートナーをビオチンで標識する。そして、第一結合パートナーを液相の状態、トロポニンIを含む生物学的液体と標識した第二結合パートナーへ添加してもよい。或いは、ヤギ又はマウスのIgGに対する抗体を固相表面に固定化し、ヤギ又はマウスのモノクローナル抗体を液相の状態、インキュベーション容器に添加してもよい。

同様に、本発明のある好ましい実施態様においては、第二結合パートナー（トロポニンCサブユニット）を、信号を発生する様々なマーカーで標識する。これには、放射性同位元素標識、酵素、化学蛍光化合物、蛍光標識、色素、酵素の補因子、ビオチン、などが含まれる（しかし、これらには限定されない）。第二結合パートナーと信号発生マーカーとのあいだの化学結合は、当業者に知られた様々な方法で作成できる。

本発明の第二の好ましい実施態様においては、トロポニンCサブユニットを固相表面に固定化し、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体（又はそれらの混合物）を信号発生マーカーで標識する。

固相の第一結合パートナーと標識第二結合パートナーが、トロポニンIを含むサンプルと接触する順序は、狭い範囲で限定されているものではない。ある好ましい実施態様においては、トロポニンIを含む生物学的液体と、固相の第一結合パートナー及び標識第二結合パートナーとを、同時に接触させる。この方法は、いわゆる”同時”アッセイ法であり、当業者によく知られているものである。適切なインキュベーション期間中に、両方の結合パートナーが生物学的液体中のトロポニンIと反応してサンドイッチを形成し、その後、固相表面を洗浄して、固相表面に結合していない試薬を除去し、当業者に知られた方法によって、信号発生マーカーを測定する。

本発明の別の実施態様においては、トロポニンIを含む生物学的液体を、まず、固相の第一結合パートナーと接触させる。適切なインキュベーション期間中に、生物学的液体中のトロポニンIが固相の第一結合パートナーと結合し、その後、固相表面を洗浄して、過剰なトロポニンIとその他のタンパク質を除去する。次に、固相の第一結合パートナーを、標識第二結合パートナーと接触させて、三元複合体、又は、”サンドイッチ”を完成させ、それに続く第二インキュベシ

ヨ

ン期間中に、標識した第二結合パートナーが、既に固相の第一結合パートナーに結合したトロポニン I と結合する。この第二のインキュベーション期間後に、固相表面を洗浄して、結合していない標識第二結合パートナーを除去し、信号発生マーカーを測定する。これは、いわゆる” 順番” 型サンドイッチイムノアッセイである。

本発明の別の実施態様は、液相の標識結合パートナーを、まず、トロポニン I 抗原を含む生物学的液体とインキュベートし、次に、固相の結合パートナーと接触させる、いわゆる” 逆” 型イムノアッセイである。この第二のインキュベーション後に、固相を洗浄して、結合していない過剰の試薬やタンパク質を除去し、信号発生マーカーを測定する。

本発明の別の実施態様として、第二抗体を用いて、” サンドイッチ” の形成を検出してもよい。例えば、トロポニン C に特異的な標識抗体を用いて、複合体を検出することもできる。

本発明によれば、2つの結合パートナーのうちの一方は、心臓のトロポニン I に特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。このようなポリクローナル抗体は、純粋な心臓トロポニン I を動物に注射し、動物から採血して、抗体を含む血清を得ることによって、従来の方法で作成できる。本発明で用いる抗体を得るためには、心臓のトロポニン I を精製するために、当業者に知られている一般的な方法のうちのどの方法を用いてもよい。ポリクローナル抗体は、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ロバ、ウマ、ブタ、ウシ、イヌ、サル、など、どの動物種で作成できる。本発明においては、好ましくは、ヤギで抗体を作成する。

本発明において結合パートナーの一つとして用いる抗体、又は、複数の抗体は、心臓型のトロポニン I に特異的でなければならず、骨格型のトロポニン I に対しては、ほとんど、又は、全く反応性を持ってはならない。

心臓に特異的な抗体をヤギから作成するための好ましい方法において、骨格型トロポニン I との交差反応性が非常に低いポリクローナル抗体を作成できることが発見された。精製したトロポニン I をヤギに注射し、従来の方法によって、動

物から血清を回収する。当業者に知られた方法によって、骨格型トロポニン I 分子とかなり相違する心臓トロポニン I 分子の一領域に対応する合成ペプチドを合

成する。このペプチドは、少なくともアミノ酸5個であり、好ましくは、少なくともアミノ酸7個である。このペプチドは、心臓トロポニン I のそのような領域に対して、少なくとも75%、好ましくは、少なくとも90%の相同性を持たなければならない。このペプチドの配列と、骨格トロポニン I の対応する領域の配列とは、少なくとも50%のアミノ酸が相違しなければならない。心臓トロポニン I のそのような領域は、骨格型には全く存在しない配列を有する：

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
-ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
-ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
-LYS-LYS-SERである。

上記の領域の好ましい断片は、以下の配列を有するペプチド：

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
-LYS-LYS-LYS-SER、及び

かなり相違する別の領域：

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA  
である

このようなペプチドを選択する際の重要な決定因子は、心臓型トロポニン I と骨格型トロポニン I の対応する領域との間の相違、及び、これらの合成ペプチドが、ヤギの抗トロポニン I 血清からどの程度の量の抗体を取り去ることができるか、である。この合成ペプチドを、従来の方法によって、アガロースビーズ上に固定化する。動物血清を固定化合成ペプチドと接触させ、この特定のペプチドに特異的な抗体とアガロースとの間で結合を形成させる。適切な接触期間の後、ビーズを緩衝液で洗浄し、従来の方法によって、精製した心臓特異的トロポニン I 抗体をビーズから溶出させる。

心臓に特異的な抗体をヤギから作成するための第二の好ましい方法では、精製したトロポニン I をヤギに注射して、従来の方法によって、動物から血清を回収する。精製した心臓トロポニン I を、従来の方法によって、アガロースビーズ上

に化学的に固定化させる。動物血清を、固定化トロポニン I と接触させ、抗体とトロポニン I との間で結合を形成させる。適切な接触期間の後、ビーズを緩衝液で洗浄し、従来の方法によって、精製した抗体をビーズから溶出させる。次に、精製した抗体を、以下のように吸収して、骨格型トロポニン I と結合する抗体を除去する。骨格筋のトロポニン I を従来の方法で精製し、アガロースビーズ上に化学的に固定化する。精製した抗体を、骨格トロポニン I ビーズと接触させ、骨格型トロポニン I と交差反応をする抗体を全て除去する。

本発明の第三の好ましい実施態様においては、Kohler と Milstein (1976) European Journal of Immunology 6: 511-519 の有名な細胞融合法を用いて、望ましい抗体を分泌するハイブリドーマを作成し、心臓のトロポニン I に特異的なマウスモノクローナル抗体を作成した。この方法は、心臓トロポニン I を注射したマウスなどの宿主動物由来の抗体産生細胞を、抗体を分泌する”ハイブリドーマ”を形成するために融合させる 2 つの細胞集団の一方として用いる方法である。第二の細胞集団は、一般に、組織培養法で生育する能力をこのようなハイブリドーマに与えるガン細胞株、又は、ミエローマ細胞株である。この 2 つの細胞集団を、ポリエチレングリコールなどを用いた当業者に知られた方法で融合させ、一般的な組織培養法によって、抗体産生細胞を増殖させる。限界希釈法によるサブクロニングによって、均一な細胞集団が得た後、インビトロ又はインビボで、標準的な方法によって、抗体産生ハイブリドーマを増殖させる。

この方法で作成したモノクローナル抗体は、未精製物としても使用できるが、最高の結果を得るためには、当業者に知られた方法によって、モノクローナル抗体を高純度（例えば 95% 以上）にまで精製する。この方法には、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、又は、固定化プロテイン A 又は固定化プロテイン G とのアフィニティクロマトグラフィーなどが含まれる。



本発明で使用される心臓に特異的な抗体（ポリクローナル、又は、マウスモノクローナルの何れか）は、完全なIgG分子として用いてもよいし、抗原結合部位を含む分子断片として用いてもよい。そのような断片には、当業者に知られた方法によって、パパイン、トリプシン、又は、ペプシンなどの酵素で消化して調

製したFab、Fab'、又は、F(ab)'<sub>2</sub>断片が含まれる。

本発明の2つの結合パートナーの一方として使用されるトロポニンCサブユニットは、様々な組織や、様々な動物種から得ることができる。トロポニンCサブユニット源としては、骨格筋、又は、心筋組織が好ましい。なぜならば、これらの組織には、トロポニンCが高濃度で含まれているためである。組織は、どのような動物種から選択してもよい、特に、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、ヒト、ウマ、ブタ、ウシ、イヌ、サルなどのほ乳類から選択される。本発明の好ましい実施態様では、ウサギの骨格筋からトロポニンCを単離した。

トロポニンCは、Potter et al. (1982) Methods in Enzymology 85:241-263などの文献で報告されている従来の方法によって単離できる。一般に、抽出、等電沈殿、イオン交換クロマトグラフィーなどのよく知られた技術を用いて単離される。本発明によって最高の結果を得るためには、トロポニンCを高純度（例えば、95%以上）にまで精製することが望ましい。

従来の遺伝子工学技術によって、トロポニンCの分子全体、又は、様々な分子断片を生合成してもよい。或いは、有機タンパク合成技術によって、トロポニンCを化学合成してもよい。本発明においては、トロポニンCの断片に対応するペプチドを使用してもよい。

本発明のイムノアッセイのインキュベーション時間と温度は、狭い範囲で限定されているものではない。インキュベーション時間は、1分から48時間の範囲であるが、好ましくは5分から120分間である。同様に、インキュベーション温度は4℃から56℃で行うことができる。好ましいインキュベーション温度は20から37℃である。

本発明のアッセイを実施するため試薬は、キットの状態に組み立てることがで

きる。そのようなキットには、別々の容器に入った心臓トロポニン I に特異的な抗体と、トロポニン C が含まれる。抗体、又は、トロポニン C を固相に固定化してもよい。抗体、又は、トロポニン C を標識してもよい。酵素標識を使用した場合には、酵素の基質をキットに含めることができる。第二抗体を用いて複合体を標識するアッセイの場合には、抗トロポニン抗体又はトロポニン C に特異的な第

二抗体がキットに含まれる。キットには、適切なスタンダード物質、陽性コントロール及び陰性コントロール、及び、アッセイを実施するための説明書を含めてもよい。

以下の例は、本発明をさらに説明するものであるが、本発明を何ら限定するものではない。

#### 例 1

##### トロポニン C の精製

##### I. 筋原繊維画分の調製

ニュージーランドタイプのウサギ 3 匹を屠殺し、後脚と背筋を切除する。組織から余分な脂肪を取り除き、1 cm 片に切断する。得られた組織（約 1785 グラム）を 6 つに分け、合計 4200 ml の 50 mM 塩化カリウム、2 mM エチレンジアミン四酢酸塩、15 mM メルカプトエタノール、0.1% トリトン X-100、及び、30  $\mu$ g/ml フェニルメチルスルホニルフルオリドを含む 20 mM Tris 緩衝液、pH 8.0（洗浄緩衝液）でホモジェナイズする。得られたホモジェネートを、7000  $\times$  g、4℃で 20 分間遠心分離し、上清を廃棄する。得られた沈殿を 4200 ml の洗浄緩衝液で再度ホモジェナイズし、再度遠心分離して沈殿を得る。このようにして合計 8 回洗浄する。最終的な沈殿を、9000 ml の 1M 塩化ナトリウム、0.1 mM 塩化カルシウム、1 mM メルカプトエタノールを含む 25 mM Tris 緩衝液、pH 8.0（抽出緩衝液）でホモジェナイズし、4℃で一晩攪拌する。得られた抽出物を、7000  $\times$  g、4℃で 1 時間遠心分離し、上清を得る（筋原繊維画分）。

##### II. 等電沈殿

ステップ I の筋原繊維画分を高速で攪拌し、1 N 塩酸を用いて、溶液の pH を

4. 6に調整する。10分間攪拌後、得られた懸濁液を、 $7000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で20分間遠心分離する。沈殿を廃棄し、上清を高速で攪拌しながら、1N水酸化ナトリウムで $\text{pH} 8.0$ に調整する。次に、固体の硫酸アンモニウムを最終濃度が60%飽和となるように溶液に添加し、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩攪拌してトロポニンタンパク質を沈殿させる。

### III. DEAEセファロース精製

ステップIIの懸濁液を、 $7000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で20分間遠心分離し、得られた沈殿を、約100mlの6M尿素、1mMエチレンジアミン四酢酸塩、1mMメルカプトエタノールを含む50mM *Tris* 緩衝液、 $\text{pH} 8.0$  (DEAE緩衝液) に溶解する。溶解したタンパク質を透析バッグへ移し、最終希釈度が少なくとも1:100万となるように、DEAE緩衝液に対して透析する。DEAEセファロースCL-6B (ファルマシア バイオテック インク.、ピスケータウェイ、ニュージャージー州) をつめた $16 \times 5 \text{ cm}$ のカラムをDEAE緩衝液で平衡化する。透析したサンプルを、 $80 \text{ ml/時間}$ の流速でカラムに供し、約450mlのDEAE緩衝液でカラムを洗浄して、12mlの画分を回収する。流速を $150 \text{ ml/時間}$ へと速め、DEAE緩衝液1リットルと、0.5M塩化カリウムを含むDEAE緩衝液1リットルを用いてトロポニンCを溶出する。トロポニンCを含む画分をプールし、窒素圧力下で、ミリポアの再生セルロース製10,000カット膜を用いて、約14mlに濃縮する。濃縮したトロポニンCを透析バッグへ移し、最終希釈度が $1/10^{12}$ となるように、10mMリン酸カリウム、1M塩化カリウム、 $\text{pH} 6.5$ に対して、 $4^{\circ}\text{C}$ で透析する。

### 例2

#### トロポニンIの精製

##### I. ゲルへのトロポニンCの結合

ヤギ抗トロポニンI抗体を作成するために、まず、*Syska et al.* (1974) *FEBS Letters* 40:253-257の方法に従って、心臓のトロポニンIを単離した。例1の方法によって単離したトロポニンC (約500mg) を、アクチゲルADLゲル (ステロジーン コーポレーション、

アルカディア、カリフォルニア州)に結合させる。まずゲル50mlを、10mMリン酸カリウム、1M塩化カリウム、pH6.5(結合緩衝液)で洗浄する。トロポニンCをゲルに添加して、シアノホウ化水素ナトリウムを最終濃度が0.1Mとなるように添加する。得られた懸濁液を室温で4時間攪拌し、カラムへ流し込んでゲルを回収する。次に、ゲルを225mlの結合緩衝液で洗浄する。ゲル

をカラムから取り出し、150mlの0.1Mエタノールアミンを含む10mMリン酸カリウム、1M塩化カリウム、pH6.5に加える。シアノホウ化水素ナトリウムを最終濃度が0.1Mとなるように添加する。懸濁液を4℃で一晩攪拌し、未反応の結合基をブロックする。次に、ゲルをカラムに戻し、150mlの結合緩衝液で洗浄し、100mlの0.15M塩化ナトリウム、0.05%アジ化ナトリウムを含む10mMリン酸カリウム、pH7.2で洗浄する。

#### II. トロポニンIの精製

死後に得たヒトの心臓1個から、過剰な脂肪と弁を取り除き、4℃で1cm片に切断する。得られた組織(約352グラム)をひとまとめとして、752mlの8M尿素、15mMメルカプトエタノール、1mM塩化カルシウムを含む75mM Tris緩衝液、pH8.0(抽出緩衝液)で、室温でホモジェナイズする。得られたホモジェネートを7000×gで30分間遠心分離し、得られた上清をチーズクロスを通して濾過して粒子を除去する(心臓抽出物)。ステップIで調製したトロポニンC結合ゲルをカラムにつめ、室温で、250mlの抽出緩衝液で洗浄する。ゲルをカラムから取り出し、濾過した心臓抽出物と混合する。得られた懸濁液を室温で80分間攪拌し、7000×gで20分間遠心分離する。上清を廃棄し、沈殿したゲルを、抽出緩衝液と共にカラムへ戻す。カラムを、合計700mlの抽出緩衝液を使って室温で洗浄し、8M尿素、15mMメルカプトエタノール、10mMエチレンジアミン四酢酸塩を含む75mM Tris緩衝液、pH8.0(溶出緩衝液)を使って、精製されたトロポニンIをカラムから溶出させる。12mlの画分を回収し、有意な量のトロポニンIを含む全ての画分をまとめてプールする。プールしたトロポニンIへ、十分な量の10mMエチ

レンジアミン四酢酸塩、15 mMメルカプトエタノールを含む75 mM Tris 緩衝液、pH 8.0を添加し、尿素濃度を8 Mから6 Mにする。得られた溶液を、窒素圧力下で、ミリポアの10,000カットの再生セルロース膜を使って濃縮し、最終液量を14.2 mlとする。最終的なタンパク質濃度は、ブラッドフォードのタンパク質アッセイ法と、スタンダード物質としてウシアルブミンを用いて測定した。

### 例 3

#### 精製ヤギ抗トロポニン I 抗体の調製

##### I. ヤギ抗トロポニン I 抗血清の調製

例2の方法から得られた精製トロポニン I を、等容量のフロインドアジュバント（不活性化した *M-tuberculosis bacilli* を含む鉱物油懸濁物）と混合する。得られた混合物をホモジェナイズして、水/油エマルジョンを作成し、初期免疫原とする。まず、ヤギに、例2のように調製した250 µgの心臓トロポニン I を含む免疫原を注射して、初期免疫する。その後1ヶ月ごとに、250 µg-500 µgの精製した心臓トロポニン I を、不活性化した *M-tuberculosis bacilli* を除いて上記と同様に調製し（不完全フロインドアジュバント）、免疫原としてヤギに注射する。注射後7-10日目に、ヤギから採血し、ヤギ抗トロポニン I 血清を得る。

##### II. 合成トロポニン I ペプチドアガロースビーズの調製

当業者に知られた固相ペプチド法により、以下の合成ペプチドを調製する：

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
-LYS-LYS-LYS-SER-CYS

簡単には、Fmoc（9-フルオレニルメトキシカルボニル）をアルファアミノ保護基として使用し、アプライド バイオシステムズ431型自動ペプチド合成機で、ペプチドを合成した。全てのアミノ酸と溶液は、アプライドバイオシステムズから購入し、合成用グレードであった。合成後、ペプチドを樹脂から切り離し、6.67%フェノール、4.4%（v/v）チオアニソール、8.8%エタネジチオールを含むトリフルオロ酢酸から成る切断カクテルを用いて、側鎖の

ブロックを外した。切り離したペプチドを沈殿させ、冷ジエチルエーテルで数回洗浄した。次に水に溶解して、凍結乾燥した。粗ペプチドを、アミノ酸分析（ウォーターズ Pico-Tag<sup>®</sup> システム）、及び、逆相HPLCに供した。逆相HPLCでは、0.1% TFA水溶液と0.1% TFA中99.9%アセトニトリルとを可動緩衝液として使用し、Vydac 8Cカラムを用いた。このペプチドが使用に適しているかどうかは、大きな単一ピークの存在と適切なアミノ酸組成を証拠として判断した。

表 I

## トロポニンIペプチドのアミノ酸組成

アミノ酸	モル% (HIS = 1.0)
ASP+ASN	0.013
GLU+GLN	0.95
SER	0.58
GLY	0.012
HIS	1.0
ARG	1.02
THR	1.00
ALA	2.98
PRO	1.02
TYR	0.98
VAL	0.008
MET	0.24
CYS2	0.14
ILE	0.009
LEU	0.03
PHE	0.006
LYS	3.13

ペプチド10mgを、20mlの5mMエチレンジアミン四酢酸塩（EDTA）を含む50mM Tris、pH 8.5に溶解することで、得られたペプチドを、6%架橋アガロースビーズ（スルフォリンクゲル、ピヤース ケミカル カン

パニー、ロックフォード、イリノイ州)に結合させる。10 mlのスルフォリンクゲルを、120 mlの5 mM EDTAを含む50 mM Tris緩衝液、pH 8.5 (結合緩衝液)を用いて、カラムの中で洗浄する。洗浄したゲルを、トロポニン I ペプチドの溶液へ添加して、室温で4時間、及び、4℃で16時間搅拌する。

得られた懸濁液をカラムに流し入れ、残りの反応基をブロックするために、さらに50 mMメルカプトエタノールを添加した結合緩衝液20 mlを加える。この懸濁液を室温で60分間搅拌し、次に、40 mlの1 M塩化ナトリウム溶液と、40 mlの0.15 M塩化ナトリウム、0.05%アジ化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール、pH 7.2で洗浄する。

#### III. 心臓に特異的なトロポニン I 抗体の単離

ステップ I で調製した抗血清を回収して、その56 mlを、56 mlの0.15 M塩化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール緩衝液、pH 7.2で希釈する。フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、ロイペプチン、アプロチニン、ペプスタチン A を、最終濃度が各々15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加して、抗血清中のプロテアーゼを阻害する。ステップ II で調製した合成ペプチドゲルを希釈した抗血清へ加え、室温で1時間搅拌する。得られた混合物をカラムへ移し、55 mlの1 M塩化ナトリウムと0.05%アジ化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール、pH 7.2で洗浄する。精製した心臓に特異的な抗体を、55 mlの第一溶出緩衝液 (イムノピュア ジェントル AG/AB 溶出緩衝液、ピヤース ケミカルカンパニー、ロックフォード、イリノイ州) と、それに続いて、55 mlの第二溶出緩衝液 (3 Mチオシアン酸ナトリウムと0.05%アジ化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール、pH 7.0) を用いて、カラムから溶出させる。これらの溶出液の両方に含まれる精製抗体を、最終希釈度が $10^6$ となるように、0.15 M塩化ナトリウムを含む5 mMイミダゾール、pH 7.2に対して透析し、窒素圧力下で約25 mlへ濃縮し、最終希釈度が $10^9$ となるように、0.15 M塩化ナトリウムと0.05%アジ化ナトリウムを含む10 mMリン酸ナトリウ

ム、pH 7.2 に対して透析する。得られた透析物を  $7000 \times g$  で15分間遠心分離し、不溶性の物質を除去する。精製された心臓に特異的なトロポニン I 抗体を含む上清のタンパク質濃度は、吸光率  $E_{1\%} = 13.0$  を用いて、280 nm で分光光度的に決定する。

#### 例 4

##### トロポニン C-アルカリホスファターゼの調製

I. 例 1 の方法で調製したトロポニン C を、以下の方法によって、アルカリホスファターゼと化学的に結合させる。107  $\mu$ l の容量のトロポニン C (3 mg) を、ジメチルスルホキシド中で 7 mg/ml の濃度となるように調製した 25  $\mu$ l の SATA 溶液 (N-サクシニミジル S-アセチルチオアセテート、ピヤース ケミカル カンパニー、ロックフォード、イリノイ州) で処理する。反応液を室温で 30 分間攪拌した後、溶液を、2 リットルの 2 mM EDTA を含む 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.5 に対して、4  $^{\circ}$ C で一晩透析する。ヒドロキシルアミンを最終濃度が 50 mM となるように添加して、SATA 修飾トロポニン C を脱アセチル化し、溶液を室温で 2 時間静置する。次に、修飾トロポニン C を、2 リットルの 2 mM EDTA を含む 30 mM トリエタノールアミン、pH 7.2 に対して、一晩透析する。1.55 ml の容量のコウシ小腸由来アルカリホスファターゼ (AP) 6 mg (バイオザイム コーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州) を、ガラス製試験管に入れる。脱イオン水で 5 mg/ml の濃度になるように新しいスルホ-SMCC 溶液 (スルホサクシニミジル 4-[N-マレイミドメチル] シクロヘキサノール-1-カルボキシレート、ピヤース ケミカル カンパニー、ロックフォード、イリノイ州) を調製する。合計 87  $\mu$ l の SMCC 溶液を AP へ添加し、室温で 1 時間攪拌する。次に、修飾 AP 溶液を、2 リットルの 5 mM 塩化マグネシウムと 1 mM 塩化亜鉛を含む 30 mM トリエタノールアミン、pH 7.2 に対して、4  $^{\circ}$ C で一晩透析する。合計 1.35 mg の SATA 修飾トロポニン C を、4 mg の SMCC 修飾 AP と混合し、4  $^{\circ}$ C で 24 時間攪拌する。メルカプトエチルアミンとヨードアセタミドを最終濃度が 10 mM となるように溶液に添加し、室温で 20 分間攪拌する。次に、得られた AP



結合トロポニンCを、セファクリルS-300（ファルマシア バイオテック  
インク、、ピスケータウェイ、ニュージャージー州）をつめた1.5×90cm  
カラムに通して、APトロポニンCコンジュゲートを未反応生成物から精製した  
。

## 例5

### ヒト骨格トロポニンIの精製

#### I. 筋原繊維画分の精製

ヒトの骨格筋組織（胸筋）を4℃で解凍し、脂肪を取り除く。合計83.6g  
ラムの組織を1cm片に切断し、750mlの50mM塩化カリウム、2mMEDTA、1%トリトンX-100界面活性剤、15mMメルカプトエタノール、  
30μg/ml PMSFを含む20mMTri s、pH8.0（洗浄緩衝液1）  
でホモジェナイズする。得られたホモジェネートを7000×gで25分間遠心  
分離し、上清を廃棄する。得られた沈殿を、750mlの洗浄緩衝液1で再度ホ  
モジェナイズし、再度遠心分離して沈殿を得る。このようにして、合計7回洗浄  
する。次に、沈殿を、洗浄緩衝液2（50mM塩化カリウム、2mMEDTA、  
15mMメルカプトエタノール、30μg/ml PMSFを含む20mMTri s、  
pH8.0）で、同様に3回洗浄する。得られた沈殿を、750mlの0.  
6Mヨウ化カリウム、0.1M塩化ナトリウム、5mM塩化マグネシウム、1m  
MEDTA、5mMアデノシン三リン酸（ATP）、5mMメルカプトエタノー  
ル、30μg/ml PMSF、1.3μg/ml ロイペプチン、1.3μg/ml  
1ペプスタチンAを含む35mMTri s、pH7.7でホモジェナイズする。  
得られた懸濁液を4℃で15分間攪拌し、7000×gで30分間遠心分離する  
。得られた上清を、最終希釈度が1/200となるように、50mM塩化ナトリ  
ウム、1mM塩化マグネシウム、0.1mMEDTA、30μg/ml PMSF  
、1mMATP、2mMメルカプトエタノールを含む35mMTri s、pH7  
.5に対して透析する。得られた溶液を、7000×gで30分間遠心分離し、  
上清を得る。

#### II. DEAEセファロースクロマトグラフィー

ステップIの上清に、固体の硫酸アンモニウムを、最終濃度が80%飽和となるように添加する。懸濁液を4℃で2 1/2時間攪拌した後、懸濁液を7000×gで30分間遠心分離する。上清を廃棄し、沈殿を、200mlの9M尿素、0.5mMEDTA、15mMメルカプトエタノール、30μg/ml PMSFを含む50mMTris、pH8.0に溶解する。得られた溶液を、最終希釈度が10<sup>4</sup>となるように、6M尿素、0.5mMEDTA、15mMメルカプトエタノール、30μg/ml PMSFを含む50mMTris、pH8.0 (DEA

E緩衝液) に対して、4℃で透析する。得られた溶液を、室温で、DEAE緩衝液で平衡化した13×4.8cmのDEAEセファロースCL-6Bカラムへ、流速90ml/時間の速度で供する。10mlの画分を回収し、トロポニンIを含む溶出画分をまとめてプールする。得られたプール液を、窒素圧力下で、ミリポア再生セルロース膜を用いて、最終容量5mlへ濃縮する。

### III. ゲル濾過クロマトグラフィー

ステップIIからの濃縮トロポニンIサンプルを、4℃で、DEAE緩衝液で平衡化した2.5×90cmのセファクリルS-300ゲルカラムへ、流速30ml/時間の速度で供する。精製された骨格トロポニンIを含む画分をまとめてプールし、最終希釈度が1/100となるように、1mMEDTAと6M尿素を含む10mMTris、pH8.0に対して透析する。最終的なタンパク質濃度は、ブラッドフォードの方法によって、ウシアルブミンをスタンダードとして決定する。

## 例6

### トロポニンIの免疫化学的アッセイ

#### I. トロポニンIの同時サンドイッチイムノアッセイ

例3に従って調製した精製トロポニンI抗体を、0.05%アジ化ナトリウムを含む100mMクエン酸ナトリウム、pH4.0で、10μg/mlに希釈する。100ulの抗体を用いて、ポリスチレン製のマイクロタイタープレート (ダイナテック コーポ. シェンクトリー、バージニア州) を室温で一晩かけてコー

トする。マイクロタイタープレートを、1 M塩化ナトリウムを含む10 mM Tris緩衝液、pH 7.2で3回洗浄し、10 mM Tris、pH 7.2、10%グルクロン酸、1%ウシ血清アルブミン、0.05%プロクリン-300（ローム アンド ハース、フィラデルフィア、ペンシルバニア州）から成る溶液で、室温で、1時間かけてブロックする。マイクロタイタープレートのウェルから余分な液体を吸引し、室温でプレートを乾燥させる。抗体でコートしたプレートは、使用時まで、4℃で保存した。例2のように調製した心臓トロポニン1を、トロポニンI不含の正常ヒト血清で、最終濃度が5、25、及び、50 ng/mlと

なるように希釈し、イムノアッセイのスタンダードとする。例4の用に調製したトロポニンC標識アルカリホスファターゼを、20%熱非働化ヤギ血清、1 mM塩化マグネシウム、0.1 mM塩化亜鉛、0.05%アジカナトリウムを含む50 mMトリエタノールアミン、pH 7.4で、5 µg/mlの濃度へ希釈する。

先に調製した抗体コートマイクロタイタープレートのウェルへ、血清サンプル、又は、トロポニンIスタンダード（20 µl）を、二連で添加した。次に、トロポニンC標識AP（80 µl）をウェルへ加え、室温で2時間インキュベートする。次に、マイクロタイタープレートのウェルを脱イオン水で5回洗浄し、全てのウェルに、5 mM塩化マグネシウム、0.1 M塩化亜鉛、0.02%トウイン20、0.05%プロクリン300を含む25 mMジエタノールアミン、pH 9.80中の0.83 mg/mlパラニトロフェニルフォスフェートから成る基質溶液（100 µl）を加える。基質溶液を、室温で30分間インキュベートし、100 µlの2 N水酸化ナトリウムを添加して反応を停止する。マイクロタイタープレート中の溶液の吸収を、適切な測定機器を用いて、405 nmで測定する。典型的なスタンダード曲線を表IIに示す。

表 I I

トロポニン I 濃度	
(ng/ml)	平均A <sup>405nm</sup>
0	0.075
5	0.105
25	0.194
50	0.359

## 例 7

トロポニン I イムノアッセイの性質

I. 心筋梗塞が記録されている患者から集めた血清 (MI 血清) と、正常で健康な被験者由来の血清 (正常血清) を、例 6 のトロポニン I イムノアッセイで試験した。また、例 5 にように調製した骨格トロポニン I を、最終濃度が  $29 \mu\text{g}/$

ml となるように正常血清に添加し、このアッセイと骨格トロポニン I との交差反応性を調べた。

表 I I I に示すように、本発明のアッセイでは、心臓発作を患う患者と、正常で健康な被験者とを明確に区別できる。また、このアッセイ系と、骨格型のトロポニン I との交差反応性は、 $< 0.01\%$  である。

表 I I I

## トロポニン I

サンプル	濃度 (ng/ml)
MI 血清 # 1	> 50 ng/ml
MI 血清 # 2	15.5 ng/ml
MI 血清 # 3	> 50 ng/ml
正常血清 # 1	0 ng/ml
正常血清 # 2	0 ng/ml
正常血清 # 3	0 ng/ml
正常血清 # 4	0 ng/ml
正常血清 # 5	0 ng/ml
正常血清	
( + 骨格トロポニン I 6 ng/ml	
29,000 ng/ml )	

## 同等の態様

当業者であれば、通常の実験によって、ここで説明した本発明の特定の実施態様と同等の態様を認識、又は、突き止めることができるであろう。そのような同等の態様は、以下の請求の範囲によって網羅されるものである。

## 配列リスト

## (1) 一般事項

## (i) 出願人：

- (A) 名前 : フォートロン バイオサイエンス インク.
- (B) ストリート : 2500 ゲートウェイ センタービル
- (C) 市町村 : モーリスビル
- (D) 州 : ノース キャロライナ
- (E) 国 : アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号 : 27560
- (G) 電話番号 : (919) 380-1778
- (H) テレファックス : (919) 380-1799

## (ii) 発明の名称：

## (iii) 配列数：3

## (iv) 連絡先：

- (A) 宛先 : ラーハイブ コックフィールド
- (B) ストリート : 60 ステイト ストリート、 スイート 510
- (C) 市町村 : ボストン
- (D) 州 : マサチューセッツ
- (E) 国 : アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号 : 02109

## (v) コンピュータ読み出し形式：

- (A) ミディアム型 : フロッピーディスク
- (B) コンピューター : IBM PC コンパティブル
- (C) オペレーティング システム : PC-DOS/MS-DOS
- (D) フォーマット : ASCIIテキスト

## (vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号 :

(B) 出願日 :

(C) 分類 :

(vii) 優先権の主張 :

(A) 出願番号 : US 08/063, 168

(B) 出願日 : 1993年5月17日

(C) 分類 :

(viii) 弁理士/代理人 :

(A) 名前 : デコンティ ジュリオ エイ.

(B) 登録番号 : 31, 503

(C) 識別番号 : FBI-003PC

(ix) 連絡先 :

(A) 電話番号 : (617) 227-7400

(B) テレファックス : (617) 227-5941

## 配列リスト

(2) 配列認識番号 : 1に関する情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 39 アミノ酸

(B) タイプ : アミノ酸

(D) トポロジー : 線状

(ii) 分子のタイプ : ペプチド

(v) 断片のタイプ : 内部

(xi) 配列の詳細 : 配列認識番号 : 1 :

Met Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro  
 1                      5                      10                      15

Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu  
                     20                      25                      30

Pro His Ala Lys Lys Lys Ser  
                     35

(2) 配列認識番号：2に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：13アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) トポロジー：線状

(ii) 分子のタイプ：ペプチド

(v) 断片のタイプ：内部

(xi) 配列の詳細：配列認識番号：2：

Arg Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys Lys Lys Ser  
 1                      5                      10

(2) 配列認識番号：3に関する情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：18アミノ酸

(B) タイプ：アミノ酸

(D) トポロジー：線状

(ii) 分子のタイプ：ペプチド

(v) 断片のタイプ：内部

(xi) 配列の詳細：配列認識番号：3：



(33)

特表平9-503050

Arg Gly Glu Lys Gly Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys Gln Pro Leu Glu  
1                      5                      10                      15

Leu Ala

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年5月8日

【補正内容】

本発明においては、トロポニンCの断片に対応するペプチドを使用してもよい。

本発明のイムノアッセイのインキュベーション時間と温度は、狭い範囲で限定されているものではない。インキュベーション時間は、1分から48時間の範囲であるが、好ましくは5分から120分間である。同様に、インキュベーション温度は4℃から56℃で行うことができる。好ましいインキュベーション温度は20から37℃である。

本発明のアッセイを実施するため試薬は、キットの状態に組み立てることができる。そのようなキットには、別々の容器に入った心臓トロポニンIに特異的な抗体と、トロポニンCが含まれる。抗体、又は、トロポニンCを固相に固定化してもよい。抗体、又は、トロポニンCを標識してもよい。酵素標識を使用した場合には、酵素の基質をキットに含めることができる。第二抗体を用いて複合体を標識するアッセイの場合には、抗トロポニン抗体又はトロポニンCに特異的な第二抗体がキットに含まれる。キットには、適切なスタンダード物質、陽性コントロール及び陰性コントロール、及び、アッセイを実施するための説明書を含めてもよい。

以下の例は、本発明をさらに説明するものであるが、本発明を何ら限定するものではない。

#### 例1

##### トロポニンCの精製

##### I. 筋原繊維画分の調製

ニュージーランドタイプのウサギ3匹を屠殺し、後脚と背筋を切除する。組織から余分な脂肪を取り除き、1cm片に切断する。得られた組織(約1785グラム)を6つに分け、合計4200mlの50mM塩化カリウム、2mMエチレンジアミン四酢酸塩、15mMメルカプトエタノール、0.1%トリトン<sup>TM</sup> X-100、及び、30 $\mu$ g/ml フェニルメチルスルホニルフルオリドを含む20

mM Tris 緩衝液、pH 8.0 (洗浄緩衝液) でホモジェナイズする。得られたホモジェネートを、 $7000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で20分間遠心分離し、上清を廃棄する。得られた沈殿を4200 mlの洗浄緩衝液で再度ホモジェナイズし、再度遠心分離して沈殿を得る。このようにして合計8回洗浄する。最終的な沈殿を、9000 mlの1M塩化ナトリウム、0.1 mM塩化カルシウム、1 mMメルカプトエタノールを含む25 mM Tris 緩衝液、pH 8.0 (抽出緩衝液) でホモジェナイズし、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩攪拌する。得られた抽出物を、 $7000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で1時間遠心分離し、上清を得る (筋原繊維画分)。

## II. 等電沈殿

ステップIの筋原繊維画分を高速で攪拌し、1 N塩酸を用いて、溶液のpHを4.6に調整する。10分間攪拌後、得られた懸濁液を、 $7000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で20分間遠心分離する。沈殿を廃棄し、上清を高速で攪拌しながら、1 N水酸化ナトリウムでpH 8.0に調整する。次に、固体の硫酸アンモニウムを最終濃度が60%飽和となるように溶液に添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩攪拌してトロポニンタンパク質を沈殿させる。

### III. DEAEセファロース<sup>TM</sup>精製

ステップIIの懸濁液を、 $7000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で20分間遠心分離し、得られた沈殿を、約100 mlの6 M尿素、1 mMエチレンジアミン四酢酸塩、1 mMメルカプトエタノールを含む50 mM Tris 緩衝液、pH 8.0 (DEAE緩衝液) に溶解する。溶解したタンパク質を透析バッグへ移し、最終希釈度が少なくとも1:100万となるように、DEAE緩衝液に対して透析する。DEAEセファロース<sup>TM</sup> CL-6B (ファルマシア バイオテック インク.、ピスケータウェイ、ニュージャージー州) をつめた $16 \times 5 \text{ cm}$ のカラムをDEAE緩衝液で平衡化する。透析したサンプルを、 $80 \text{ ml/時間}$ の流速でカラムに供し、約450 mlのDEAE緩衝液でカラムを洗浄して、12 mlの画分を回収する。流速を $150 \text{ ml/時間}$ へと速め、DEAE緩衝液1リットルと、0.5 M塩化カリウムを含むDEAE緩衝液1リットルを用いてトロポニンCを溶出する。トロポニンCを含む画分をプールし、窒素圧力下で、ミリポアの再生セルローズ

製10,000カット膜を用いて、約14mlに濃縮する。濃縮したトロポニンCを透析バッグへ移し、最終希釈度が $1/10^{12}$ となるように、10mMリン酸カリウム、1M塩化カリウム、pH6.5に対して、4℃で透析する。

## 例2

### トロポニンIの精製

#### I. ゲルへのトロポニンCの結合

ヤギ抗トロポニンI抗体を作成するために、まず、Syska et al. (1974) FEBS Letters 40:253-257の方法に従って、心臓のトロポニンIを単離した。例1の方法によって単離したトロポニンC (約500mg)を、アクチゲル<sup>TM</sup>ADLゲル(ステロジーン コーポレーション、アルカディア、カリフォルニア州)に結合させる。まずゲル50mlを、10mM

表 I

トロポニン I ペプチドのアミノ酸組成

<u>アミノ酸</u>	<u>モル% (HIS = 1.0)</u>
ASP+ASN	0.013
GLU+GLN	0.95
SER	0.58
GLY	0.012
HIS	1.0
ARG	1.02
THR	1.00
ALA	2.98
PRO	1.02
TYR	0.98
VAL	0.008
MET	0.24
CYS2	0.14
ILE	0.009
LEU	0.03
PHE	0.006
LYS	3.13

ペプチド10mgを、20mlの5mMエチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)を含む50mMTris、pH8.5に溶解することで、得られたペプチドを、6%架橋アガロースビーズ(スルフォリンク<sup>TM</sup>ゲル、ピヤース ケミカル カンパニー、ロックフォード、イリノイ州)に結合させる。10mlのスルフォリンク<sup>TM</sup>ゲルを、120mlの5mMEDTAを含む50mMTris緩衝液、pH

8.5(結合緩衝液)を用いて、カラムの中で洗浄する。洗浄したゲルを、トロポニン I ペプチドの溶液へ添加して、室温で4時間、及び、4℃で16時間攪拌する。得られた懸濁液をカラムに流し入れ、残りの反応基をブロックするために、さらに50mMメルカプトエタノールを添加した結合緩衝液20mlを加える

。この懸濁液を室温で60分間攪拌し、次に、40mlの1M塩化ナトリウム溶液と、40mlの0.15M塩化ナトリウム、0.05%アジ化ナトリウムを含む5mMイミダゾール、pH7.2で洗浄する。

### III. 心臓に特異的なトロポニンI抗体の単離

ステップIで調製した抗血清を回収して、その56mlを、56mlの0.15M塩化ナトリウムを含む5mMイミダゾール緩衝液、pH7.2で希釈する。フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、ロイペプチン、アプロチニン、ペプスタチンAを、最終濃度が各々15 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、0.75 $\mu$ g/mlとなるように添加して、抗血清中のプロテアーゼを阻害する。ステップIIで調製した合成ペプチドゲルを希釈した抗血清へ加え、室温で1時間攪拌する。得られた混合物をカラムへ移し、55mlの1M塩化ナトリウムと0.05%アジ化ナトリウムを含む5mMイミダゾール、pH7.2で洗浄する。精製した心臓に特異的な抗体を、55mlの第一溶出緩衝液(イムノピュア<sup>TM</sup> ジェントル AG/AB 溶出緩衝液、ピヤース ケミカル カンパニー、ロックフォード、イリノイ州)と、それに続いて、55mlの第二溶出緩衝液(3Mチオシアン酸ナトリウムと0.05%アジ化ナトリウムを含む5mMイミダゾール、pH7.0)を用いて、カラムから溶出させる。これらの溶出液の両方に含まれる精製抗体を、最終希釈度が10<sup>6</sup>となるように、0.15M塩化ナトリウムを含む5mMイミダゾール、pH7.2に対して透析し、窒素圧力下で約25mlへ濃縮し、最終希釈度が10<sup>9</sup>となるように、0.15M塩化ナトリウムと0.05%アジ化ナトリウムを含む10mMリン酸ナトリウム、pH7.2に対して透析する。得られた透析物を7000 $\times$ gで15分間遠心分離し、不溶性の物質を除去する。精製された心臓に特異的なトロポニンI抗体を含む上清のタンパク質濃度は、吸光率E、1% = 13.0を用いて、280nmで分光光度的に決定する。

### 例4

#### トロポニンC-アルカリホスファターゼの調製

I. 例1の方法で調製したトロポニンCを、以下の方法によって、アルカリホス

ファターゼと化学的に結合させる。107  $\mu$ lの容量のトロポニンC (3mg)を、ジメチルスルホキシド中で7mg/mlの濃度となるように調製した25  $\mu$ lのSATA溶液(N-サクシニミジル S-アセチルチオアセテート、ピヤース ケミカル カンパニー、ロックフォード、イリノイ州)で処理する。反応液を室温で30分間攪拌した後、溶液を、2リットルの2mMEDTAを含む50mMリン酸ナトリウム、pH7.5に対して、4℃で一晩透析する。ヒドロキシルアミンを最終濃度が50mMとなるように添加して、SATA修飾トロポニンCを脱アセチル化し、溶液を室温で2時間静置する。次に、修飾トロポニンCを、2リットルの2mMEDTAを含む30mMトリエタノールアミン、pH7.2に対して、一晩透析する。1.55mlの容量のコウシ小腸由来アルカリホスファターゼ(AP)6mg(バイオザイム コーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州)

を、ガラス製試験管に入れる。脱イオン水で5mg/mlの濃度になるように新しいスルホ-SMCC溶液(スルホサクシニミジル 4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサノール-1-カルボキシレート、ピヤース ケミカル カンパニー、ロックフォード、イリノイ州)を調製する。合計87  $\mu$ lのSMCC溶液をAPへ添加し、室温で1時間攪拌する。次に、修飾AP溶液を、2リットルの5mM塩化マグネシウムと1mM塩化亜鉛を含む30mMトリエタノールアミン、pH7.2に対して、4℃で一晩透析する。合計1.35mgのSATA修飾トロポニンCを、4mgのSMCC修飾APと混合し、4℃で24時間攪拌する。メルカプトエチルアミンとヨードアセタミドを最終濃度が10mMとなるように溶液に添加し、室温で20分間攪拌する。次に、得られたAP結合トロポニンCを、セファクリル™S-300(ファルマシア バイオテック インク.、ピスケータウェイ、ニュージャージー州)をつめた1.5×90cmカラムに通して、APトロポニンCコンジュゲートを未反応生成物から精製した。

#### 例5

#### ヒト骨格トロポニンIの精製

##### I. 筋原繊維画分の精製

ヒトの骨格筋組織（胸筋）を4℃で解凍し、脂肪を取り除く。合計83.6グラムの組織を1cm片に切断し、750mlの50mM塩化カリウム、2mMEDTA、1%トリトン<sup>TM</sup>X-100界面活性剤、15mMメルカプトエタノール、30μg/ml PMSFを含む20mM Tris、pH8.0（洗浄緩衝液1）でホモジェナイズする。得られたホモジェネートを7000×gで25分間遠心分離し、上清を廃棄する。得られた沈殿を、750mlの洗浄緩衝液1で再度ホモジェナイズし、再度遠心分離して沈殿を得る。このようにして、合計7回洗浄する。次に、沈殿を、洗浄緩衝液2（50mM塩化カリウム、2mMEDTA、15mMメルカプトエタノール、30μg/ml PMSFを含む20mM Tris

s、pH8.0）で、同様に3回洗浄する。得られた沈殿を、750mlの0.6Mヨウ化カリウム、0.1M塩化ナトリウム、5mM塩化マグネシウム、1mMEDTA、5mMアデノシン三リン酸（ATP）、5mMメルカプトエタノール、30μg/ml PMSF、1.3μg/ml ロイペプチン、1.3μg/ml ペプスタチンAを含む35mM Tris、pH7.7でホモジェナイズする。得られた懸濁液を4℃で15分間攪拌し、7000×gで30分間遠心分離する。得られた上清を、最終希釈度が1/200となるように、50mM塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、0.1mMEDTA、30μg/ml

PMSF、1mMATP、2mMメルカプトエタノールを含む35mM Tris、pH7.5に対して透析する。得られた溶液を、7000×gで30分間遠心分離し、上清を得る。

#### II. DEAEセファロース<sup>TM</sup>クロマトグラフィー

ステップIの上清に、固体の硫酸アンモニウムを、最終濃度が80%飽和となるように添加する。懸濁液を4℃で2 1/2時間攪拌した後、懸濁液を7000×gで30分間遠心分離する。上清を廃棄し、沈殿を、200mlの9M尿素、0.5mMEDTA、15mMメルカプトエタノール、30μg/ml PMSFを含む50mM Tris、pH8.0に溶解する。得られた溶液を、最終希釈



度が $10^4$ となるように、6 M尿素、0.5 mM EDTA、15 mMメルカプトエタノール、 $30 \mu\text{g/ml}$  PMSFを含む50 mM Tris、pH 8.0 (DEAE緩衝液) に対して、4℃で透析する。得られた溶液を、室温で、DEAE緩衝液で平衡化した $13 \times 4.8 \text{ cm}$ のDEAEセファロース<sup>TM</sup> CL-6Bカラムへ、流速 $90 \text{ ml/時間}$ の速度で供する。 $10 \text{ ml}$ の画分を回収し、トロポニンIを含む溶出画分をまとめてプールする。得られたプール液を、窒素圧力下で、ミリポア再生セルロース膜を用いて、最終容量 $5 \text{ ml}$ へ濃縮する。

### III. ゲル濾過クロマトグラフィー

ステップIIからの濃縮トロポニンIサンプルを、4℃で、DEAE緩衝液で平衡化した $2.5 \times 90 \text{ cm}$ のセファクリル<sup>TM</sup> S-300ゲルカラムへ、流速 $30 \text{ ml/時間}$ の速度で供する。精製された骨格トロポニンIを含む画分をまとめてプールし、最終希釈度が $1/100$ となるように、1 mM EDTAと6 M尿素を含む10 mM Tris、pH 8.0に対して透析する。最終的なタンパク質濃度は、ブラッドフォードの方法によって、ウシアルブミンを標準として決定する。

## 例6

### トロポニンIの免疫化学的アッセイ

#### I. トロポニンIの同時サンドイッチイムノアッセイ

例3に従って調製した精製トロポニンI抗体を、0.05%アジ化ナトリウムを含む100 mMクエン酸ナトリウム、pH 4.0で、 $10 \mu\text{g/ml}$ に希釈する。 $100 \text{ ul}$ の抗体を用いて、ポリスチレン製のマイクロタイタープレート (ダイナテック コーポ. シェンクトリー、バージニア州) を室温で一晩かけてコートする。マイクロタイタープレートを、

1 M塩化ナトリウムを含む10 mM Tris緩衝液、pH 7.2で3回洗浄し、10 mM Tris、pH 7.2、10%グルクロン酸、1%ウシ血清アルブミン、0.05%プロクリン<sup>TM</sup>-300 (ローム アンド ハース、フィラデルフィア、ペンシルバニア州) から成る溶液で、室温で、1時間かけてブロックする。

マイクロタイタープレートのウェルから余分な液体を吸引し、室温でプレートを乾燥させる。抗体でコートしたプレートは、使用時まで、4℃で保存した。例2のように調製した心臓トロポニンIを、トロポニンI不含の正常ヒト血清で、最終濃度が5、25、及び、50 ng/mlとなるように希釈し、イムノアッセイのスタンダードとする。例4の用に調製したトロポニンC標識アルカリホスファターゼを、20%熱非働化ヤギ血清、1 mM塩化マグネシウム、0.1 mM塩化亜鉛、0.05%アジカナトリウムを含む50 mMトリエタノールアミン、pH 7.4で、5 µg/mlの濃度へ希釈する。

先に調製した抗体コートマイクロタイタープレートのウェルへ、血清サンプル、又は、トロポニンIスタンダード(20 µl)を、二連で添加した。次に、トロポニンC標識AP(80 µl)をウェルへ加え、室温で2時間インキュベートする。次に、マイクロタイタープレートのウェルを脱イオン水で5回洗浄し、全てのウェルに、5 mM塩化マグネシウム、0.1 M塩化亜鉛、0.02%トウイン20、0.05%プロクリン<sup>TM</sup> 300を含む25 mMジエタノールアミン、pH 9.80中の0.83 mg/mlパラニトロフェニルフォスフェートから成る基質溶液(100 µl)を加える。基質溶液を、室温で30分間インキュベートし、100 µlの2 N水酸化ナトリウムを添加して反応を停止する。マイクロタイタープレート中の溶液の吸収を、適切な測定機器を用いて、405 nmで測定する。典型的なスタンダード曲線を表IIに示す。

表II

トロポニンI濃度	
(ng/ml)	平均A <sup>405nm</sup>
0	0.075
5	0.105
25	0.194
50	0.359

10. 前記トロポニンCが、ウサギの骨格筋から得られたものである、ことを特徴とする請求項1記載のアッセイ。

11. 前記抗体が、骨格トロポニンIには存在しない心臓トロポニンIの領域に

対して少なくとも75%の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニンIの対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも50%のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項1記載のアッセイ。

12. 前記ペプチドが：

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

から成る群より選択される配列全体、又は、配列の一部のアミノ酸配列を持つ、ことを特徴とする請求項11記載のアッセイ。

13. 前記抗体が、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、又は、その一部のアミノ酸配列を持つペプチ

ドに特異的なモノクローナル抗体、又は、ポリクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項1記載のアッセイ。

14. 心臓トロポニンIのアッセイを行うための試薬を含むキットであって：

a. 心臓トロポニンIに特異的な抗体、又は、抗体断片、及び、

b. トロポニンC、又は、そのトロポニンI結合断片、から成る、ことを特徴

とするキット。

15. 前記トロポニンCが、酵素標識されている、ことを特徴とする請求項14記載のキット。

16. 前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、及び、ベータガラクトシダーゼから成る群より選択される、ことを特徴とする請求項15記載のキット。

17. 前記トロポニンCが、ウサギの骨格筋から得られたものである、ことを特徴とする請求項14記載のキット。

18. 前記抗体が、

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

から成る群より選択されるペプチドに特異的なモノクローナル抗体、又は、ポリクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項14記載のキット。

19. 生物学的液体中の心臓トロポニンIを定量するための固相イムノアッセイであって：

a. i) 生物学的液体サンプル；

ii) 心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体、又は、抗体断片を含む固相免疫吸着剤；及び

iii) 標識トロポニンC、又は、そのトロポニンI結合断片を、

前記サンプル中のトロポニンIが、前記固定化抗体、及び、前記標識トロ

ポニンCと複合体を形成するために十分な条件下で、同時にインキュベートし；

b. 前記サンプルから前記固相免疫吸着剤を分離し；

c. 前記生物学的液体中の心臓トロポニンIの量の指標として、前記固相に結

合した標識トロポニンC又はその断片の量、又は、結合していない標識トロポニンCまたはその断片の量を検出する、

ことを特徴とする固相イムノアッセイ。

20. 前記生物学的液体が、血清である、ことを特徴とする請求項19記載のイムノアッセイ。

21. 前記固相が、プラスチック表面である、ことを特徴とする請求項19記載のイムノアッセイ。

22. 前記トロポニンCが、酵素標識されている、ことを特徴とする請求項19記載のイムノアッセイ。

23. 前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、及び、ベータガラクトシダーゼから成る群より選択される、ことを特徴とする請求項22記載のイムノアッセイ。

24. 前記トロポニンCが、ウサギの骨格筋から得られたものである、ことを特徴とする請求項19記載のイムノアッセイ。

25. 前記抗体が、骨格トロポニンIには存在しない心臓トロポニンIの領域に対して少なくとも75%の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニンIの対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも50%のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体である、ことを特徴とする請求項19記載のイムノアッセイ。

26. 前記ペプチドが；

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-

ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA  
から成る群より選択される配列全体、又は、配列の一部のアミノ酸配列を持つ、  
ことを特徴とする請求項25記載のイムノアッセイ。

27. 前記ポリクローナル抗体が、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

というペプチドに特異的である、ことを特徴とする請求項19記載のイムノアッ  
セイ。

28. トロポニンIの固相イムノアッセイを行うための試薬キットであって：

a. 心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体、又は、抗体断片を含む  
固相免疫吸着剤、及び、

b. 標識トロポニンC、又は、そのトロポニンI結合断片、から成る、  
ことを特徴とするキット。

29. 前記トロポニンCが、酵素標識されている、ことを特徴とする請求項28  
記載のキット。

30. 前記酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、及び、ベータ  
ガラクトシダーゼから成る群より選択される、ことを特徴とする請求項29記載  
のキット。

31. 前記トロポニンCが、ウサギの骨格筋から得られたものである、ことを特

徴とする請求項28記載のキット。

32. 前記ポリクローナル抗体が、

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-SER、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、及び、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

から成る群より選択されるペプチドに特異的である、ことを特徴とする請求項28記載のキット。

33. MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

から成る群より選択されるペプチドに特異的なポリクローナル抗体。

34. MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

から成る群より選択されるペプチドに特異的なモノクローナル抗体。

35. 骨格トロポニンIには存在しない心臓トロポニンIの領域に対して少なくとも75%の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニンIの対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも50%のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体製剤。

36. MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

及び、これらの一部分から成る群より選択されるペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする請求項35記載の心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体製剤。

37. 前記抗トロポニンI抗血清が、精製した心臓トロポニンIで動物を免役することによって調製される、ことを特徴とする請求項35記載のポリクローナル抗体製剤。

38. 前記ポリクローナル製剤が、インビトロ用途である、ことを特徴とする請求項35記載のポリクローナル抗体製剤。



39. 前記抗トロポニン I 抗血清が、精製した心臓トロポニン I で動物を免役することによって調製される、ことを特徴とする請求項 36 記載のポリクローナル抗体製剤。

40. ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

というペプチドに特異的なポリクローナル抗体。

41. ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

というペプチドに特異的なモノクローナル抗体。

42. ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

というペプチド、又は、この一部分を含む固相と、抗トロポニン I 抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする請求項 35 記載の心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体製剤。

43. 前記抗トロポニン I 抗血清が、精製した心臓トロポニン I で動物を免役することによって調製される、ことを特徴とする請求項 42 記載のポリクローナル抗体製剤。

44. 骨格トロポニン I には存在しない心臓トロポニン I の領域に対して少なくとも 75% の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニン I の対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも 50% のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニン I 抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が

前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出する、ことを特徴とする心臓

トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体の調製方法。

45. 前記抗トロポニン I 抗血清が、精製した心臓トロポニン I で動物を免疫することによって調製される、ことを特徴とする請求項 44 記載の方法。

46. 前記心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体が、

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-  
ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-  
ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-  
ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-  
LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-  
LYS-LYS-LYS-SER、

及び、これらの一部分から成る群より選択されるペプチドを含む固相と、抗トロポニン I 抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする請求項 44 記載の方法。

47. 前記抗トロポニン I 抗血清が、精製した心臓トロポニン I で動物を免疫することによって調製される、ことを特徴とする請求項 46 記載の方法。

48. 請求項 35 の前記心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体が、

ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-  
THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

というペプチド、又は、この一部分を含む固相と、抗トロポニン I 抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする請求項 44 記載の方法。

43. 前記抗トロポニン I 抗血清が、精製した心臓トロポニン I で動物を免疫す

ることによって調製される、ことを特徴とする請求項48記載の方法。

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年7月31日

【補正内容】

35. 骨格トロポニンIには存在しない心臓トロポニンIの領域に対して少なくとも75%の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニンIの対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも50%のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体製剤。

36. MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

及び、これらの一部分から成る群より選択されるペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする請求項35記載の心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体製剤。

37. 前記抗トロポニンI抗血清が、精製した心臓トロポニンIで動物を免疫することによって調製される、ことを特徴とする請求項35記載のポリクローナル抗体製剤。

38. 前記ポリクローナル製剤が、インビトロ用途である、ことを特徴とする請

求項35記載のポリクローナル抗体製剤。

39. 前記抗トロポニンI抗血清が、精製した心臓トロポニンIで動物を免役す

ることによって調製される、ことを特徴とする請求項36記載のポリクローナル抗体製剤。

40. ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

というペプチドに特異的なポリクローナル抗体。

41. ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

というペプチドに特異的なモノクローナル抗体。

42. ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA

というペプチド、又は、この一部分を含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする請求項35記載の心臓トロポニンIに特異的なポリクローナル抗体製剤。

43. 前記抗トロポニンI抗血清が、精製した心臓トロポニンIで動物を免役することによって調製される、ことを特徴とする請求項42記載のポリクローナル抗体製剤。

44. 骨格トロポニンIには存在しない心臓トロポニンIの領域に対して少なくとも75%の相同性を有するアミノ酸配列を持つペプチド、又は、骨格トロポニンIの対応領域とはアミノ酸配列の少なくとも50%のアミノ酸が相違するペプチドを含む固相と、抗トロポニンI抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が

前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出する、ことを特徴とする心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体の調製方法。

45. 前記抗トロポニン I 抗血清が、精製した心臓トロポニン I で動物を免疫することによって調製される、ことを特徴とする請求項 44 記載の方法。

46. 前記心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体が、

MET-ALA-ASP-GYL-SER-SER-ASP-ALA-ALA-ARG-GLU-PRO-ARG-PRO-ALA-PRO-ALA-PRO-ILE-ARG-ARG-ARG-SER-SER-ASN-TYR-ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

及び、

ARG-ALA-TYR-ALA-THR-GLU-PRO-HIS-ALA-LYS-LYS-LYS-SER、

及び、これらの一部分から成る群より選択されるペプチドを含む固相と、抗トロポニン I 抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによって調製される、ことを特徴とする請求項 44 記載の方法。

47. 前記抗トロポニン I 抗血清が、精製した心臓トロポニン I で動物を免疫することによって調製される、ことを特徴とする請求項 46 記載の方法。

48. 請求項 35 の前記心臓トロポニン I に特異的なポリクローナル抗体が、  
ARG-GLY-GLU-LYS-GLY-ARG-ALA-LEU-SER-THR-ARG-CYS-GLN-PRO-LEU-GLU-LEU-ALA  
というペプチド、

又は、この一部分を含む固相と、抗トロポニン I 抗血清とを、前記ペプチドに特異的な抗体が前記固相へ結合できるような条件下で接触させ；前記固相を前記抗血清から分離し、その後、結合した前記抗体を前記固相から溶出することによ

て調製される、ことを特徴とする請求項44記載の方法。

49. 前記抗トロポニンI抗血清が、精製した心臓トロポニンIで動物を免役することによって調製される、ことを特徴とする請求項48記載の方法。

50. サンドイッチイムノアッセイで用いるための請求項35記載のポリクロナル抗体製剤。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 94/05468

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 5 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/543 C12P21/08 C07K15/06 C07K15/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 G01N C12P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOL. IMMUNOL. (1992), 29(2), 271-8 CODEN: MOIMDS; ISSN: 0161-5890, 1992 Larue, Catherine et al 'New monoclonal antibodies as probes for human cardiac troponin: epitopic analysis with synthetic peptides'	1-11, 14-17, 19-25, 28-31, 35
A	see the whole document	12, 13, 18, 26, 27, 32-34, 36
Y	GB, A, 2 200 358 (UNIVERSITY OF BIRMINGHAM) 3 August 1988  see the whole document	1-11, 14-17, 19-25, 28-31, 35
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to undermand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 October 1994		25. 10. 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Döpfer, K-P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 94/05468

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CLINICAL CHEMISTRY., vol.38, no.11, November 1992, WINSTON US pages 2203 - 2214 GEZA S. BODOR, SHARON PORTER, YVONNE LANDT, AND JACK H. LADENSON 'Development of Monoclonal Antibodies for an Assay of Cardiac Troponin-I and Preliminary Results in Suspected Cases of Myocardial Infarction' cited in the application see the whole document ---	1-36
A	J. MOL. CELL. CARDIOL. (1987), 19(10), 999-1010 CODEN: JMCDAY;ISSN: 0022-2828, 1987 CUMMINS, BERNADETTE ET AL 'Cardiac specific troponin - I release in canine experimental myocardial infarction: development of a sensitive enzyme-linked immunoassay' see page 1000, right column, line 27 - page 1001, right column, line 12 see page 1003, left column, line 4 - page 1004, left column, line 11 see page 1007, left column, line 24 - right column, line 41 ---	1-36
A	AMERICAN HEART JOURNAL, vol.113, no.6, 1987, ST. LOUIS, MO, US pages 1333 - 1344 BERNADETTE CUMMINS ET AL. 'Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction' cited in the application see page 1335, left column, line 8 - right column, line 33 see page 1337, right column, line 3 - page 1340, right column, line 13 ---	1-36
A	FEBS LETTERS, vol.270, no.1,2, September 1990, AMSTERDAM NL pages 57 - 61 WILLIAMS J. VALLINS ET AL. 'Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction' see the whole document ---	1,12,13, 18,19, 26,27, 32-36
A	BIOCHEM. SOC. TRANS. (1987), 15(6), 1060-1 CODEN: BCSTB5;ISSN: 0300-5127, 1987 CUMMINS, BERNADETTE ET AL 'Immunoassay of the cardiac-specific isoform of troponin' see the whole document ---	1-11, 14-17, 19-25, 28-31,35
-/--		



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 94/05468

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NATURE., vol.271, 5 January 1978, LONDON GB pages 31 - 35 J.M. WILKINSON ET AL. 'Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles' ---	
A	EP.A,D 394 819 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 31 October 1990 -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.  
PCT/US 94/05468

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A-2200358	03-08-88	NONE	
EP-A-0394819	31-10-90	DE-A- 3922873 JP-A- 3007597	31-10-90 14-01-91

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	
G 0 1 N 33/50		0276-2J	G 0 1 N 33/50	T
33/531		0276-2J	33/531	A
// A 6 1 K 39/395		9284-4C	A 6 1 K 39/395	D
		9284-4C		N

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, G B, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, S K, TJ, TT, UA, UZ, VN

(72)発明者 ツァートマン レスリー オー.  
アメリカ合衆国 15801 ペンシルバニア  
州 デュボイス、トレジャー レイク  
875

(72)発明者 バーガス アネット エム.  
アメリカ合衆国 59074 モンタナ州 ラ  
イゲイト、ロシメイ ロード 361

(72)発明者 トレッティー ステイシー エイ.  
アメリカ合衆国 15865 ペンシルバニア  
州 サイクスビル、イースト メイン ス  
トリート 111